DOI:10.11931/guihaia.gxzw201912020

生长素输出载体蛋白 PIN1 在作物根和胚中的亚细胞定位

武丽霞 [1,2,3]，韩丽 [1,2,3]，赵宜婷 [1,2,3]，周璇 [1,2,3]，杜云龙 [1,2,3*]

（1. 云南农业大学 植物保护学院，昆明 650201； 2. 云南生物资源保护与利用国家重点实验室，云南农业大学 昆明 650201；3. 云南农业大学农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室，昆明 650201）

摘　要：生长素输出载体在植物发育中起非常重要的作用。然而，生长素输出载体蛋白 PIN1 在农作物水稻、小麦、玉米和大豆的根和胚中的亚细胞定位尚不清楚。在该项研究中，我们首先分析了 OsPIN1b 和它的同源物的氨基酸序列特征，发现小麦（TaPIN1）、玉米（ZmPIN1b）和大豆（GmPIN1b）中的 PIN1 序列与水稻的 OsPIN1b 序列分别具有 61.5 %、62.5 %、61.9 % 的相似性。我们进一步根据水稻 Nipponbare 的 OsPIN1b 的氨基酸序列，人工合成 OsPIN1b 多肽并注射入健康的新西兰白兔获得了抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体，在通过免疫印迹方法检测抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体的有效性后，发现可以利用该抗体可以有效检测到水稻叶片及根中 OsPIN1b 的表达。为检测 OsPIN1 及其同源物在不同作物胚根和胚中子叶细胞的定位，利用制备的抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体并通过免疫组化实验，发现水稻的 OsPIN1b、小麦的 TaPIN1 和玉米的 ZmPIN1b 非极性定位在早期的胚根和胚中子叶的表皮细胞的细胞质膜上，大豆中的 GmPIN1b 非极性定位在胚根表皮细胞的质膜上，而在胚的子叶细胞中是胞质定位。为进一步检测水稻中 OsPIN1b 的亚细胞定位，对水稻根分生区表皮细胞用蛋白质转运抑制剂 BFA (brefeldin A)及抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体处理后，进行免疫组化实验，发现水稻中的 OsPIN1b 可以通过胞吞转运途径从水稻根表皮细胞膜进入细胞质中。本研究利用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体有效检测了 OsPIN1b 及其同源物在水稻、小麦、玉米和大豆的胚根表皮细胞及胚中子叶表皮细胞的亚细胞定位，这将有助于进一步揭示生长素输出载体 OsPIN1b 及其同源物通过调控生长素极性运输而参与作物发育的作用机制。

关键词：生长素输出载体，PIN1，水稻，小麦，玉米，大豆

中图分类号：Q943　　　　　　　　**文献标识码：**A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)：



Characterization of subcellular localization of auxin efflux protein PIN1 in crop root and embryo

基金项目：国家自然科学基金（31460453，31660501，31860064）；云南省教育厅重大科研专项计划（ZD2015005）；教育部留学回国人员科研启动基金（[2013] 1792)；云南省应用基础研究计划的重点项目（2017FA018）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460453, 31660501, 31860064); the Major Special Program for Scientific Research, Education Department of Yunnan Province (ZD2015005); the Project Sponsored by SRF for ROCS, SEM ([2013] 1792) ; the Key Projects of Applied Basic Research Plan of Yunnan Province (2017FA018)]。

作者简介：武丽霞(1994-)，女，山西吕梁人，硕士研究生，研究方向为水稻根系发育，（E-mail）2416206248@qq.com。

***通信作者：**杜云龙，博士，教授，研究方向为激素与根系发育，（E-mail）yunlongdu@aliyun.com。

WU Lixia[1,2,3], HAN Li [1,2,3], ZHAO Yiting [1,2,3], ZHOU Xuan[1,2,3], DU Yunlong[1,2,3]*

(1. *College of Plant Protection*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China; 2. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources*, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. *Key Laboratory of Agro-Biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China)

Abstract: Auxin efflux carrier plays an extremely important role in plant development. However, the subcellular localization of auxin efflux carrier PIN1 in the roots and embryos of crops rice, wheat, maize and soybean remains unclear. In this study, we first analyzed the characterization of OsPIN1b and its homologous amino acid sequence, it showed that the PIN1 sequences of wheat (TaPIN1), maize (ZmPIN1b) and soybean (GmPIN1b) shared 61.5%, 62.5% and 61.9% identities with rice OsPIN1b, respectively. Next, an artificial OsPIN1b polypeptide was synthesized based on the OsPIN1b amino acid sequence of rice Nipponbare and injected it into healthy New Zealand white rabbits to obtain anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody. The effectiveness of the prepared polyclonal antibody against OsPIN1b was detected by immune blot method, and found that the expression of OsPIN1b could be effectively detected in rice leaves and roots. Furthermore, the subcellular localization of OsPIN1 and its homologous in primary roots and cotyledon cells of embryos in different crops was detected with anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody by immunohistochemistry assay. The results showed that rice OsPIN1b, wheat TaPIN1 and maize ZmPIN1 apolarly localized on the plasma membrane of epidermal cells of primary roots and cotyledon of embryo in rice, wheat and maize grown in early development stages, and soybean GmPIN1b apolarly localized on the plasma membrane of primary root epidermal cells, but was cytosolic localization in the cotyledon cells of embryo. To further detect the subcellular localization of OsPIN1b, epidermal cells of rice primary root meristem region were treated with protein transport inhibitors BFA (brefeldin A) and anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody and detected by immunohistochemistry assay. It showed that OsPIN1b localized on cytoplasma membrane of rice root epidermal cells could enter into the cytoplasm via endocytic trafficking manner. In this study, the subcellular localization of OsPIN1b and its homologous in the epidermal cells of primary roots and cotyledons of embryos of rice, wheat, maize and soybean was effectively detected with the anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody, and it will facilitate us to reveal the molecular mechanism of auxin efflux carrier OsPIN1b and its homologous by regulating polar auxin transport to involve in crops development.

Key words: auxin efflux carrier, PIN1, rice, wheat, maize, soybean

生长素输出载体蛋白在调节植物生长素极性运输中起重要作用。生长素极性运输参与胚胎形态发生（Blilou et al., 2005）和侧生器官的形成(Casimiro et al., 2001)。拟南芥基因组中的 PIN 基因家族编码 PIN1-8 的 8 种生长素输出载体蛋白(Friml et al., 2003; Benjamins & Scheres, 2008)。PIN 蛋白可以通过内吞作用转运到细胞质中，并形成循环小泡返回质膜(Geldner et al., 2001)。*AtPIN1* 突变体植株表现出针状花序并且花和维管组织发育表现明显缺陷(Galweiler et al., 1998)。AtPIN1 的极性定位还影响胚胎的发育(Friml et al., 2003)。AtPIN1 分布于维管组织(Galweiler et al., 1998)，木质部薄壁组织(Gälweiler et al., 1998; Palme & Galweiler, 1999)，根表皮，皮层细胞(Blilou et al., 2005)，分生组织表皮和原基表皮(Guenot et al., 2012)的细胞质中。但是，目前人们对单子叶植物和双子叶植物之间 PIN1 蛋

白的亚细胞定位差异仍不清楚。

AtPIN1 的同源基因可以存在于水稻(Xu et al., 2005; Li et al., 2019)、小麦(Singh et al., 2018)、玉米(Gallavotti et al., 2008)和大豆(Wang et al., 2015)的基因组中。在水稻的维管组织和根原基中可以检测到 OsPIN1 的表达(Xu et al., 2005)，OsPIN1 以生长素依赖性的方式参与水稻根、茎、花序和分蘖的发育(Xu et al., 2005; Li et al., 2019)。ZmPIN1a 主要定位在玉米幼苗的上叶原基(Gallavotti et al., 2008)，根中的中柱鞘细胞和内皮层细胞(Carraro et al., 2006)，胚芽鞘(Kamada et al., 2018)和叶片(Moon et al., 2013)的表层细胞。此外，ZmPIN1a 在根冠细胞中显示胞质定位(Forestan et al., 2012)，在花序初生原基细胞中显示非极性定位(Skirpan et al., 2009)。但是，目前尚不清楚 PIN1 在不同作物的根和胚中的亚细胞定位，包括水稻、小麦、玉米和大豆。

在这项研究中，我们基于水稻 Nipponbare 的 OsPIN1b 氨基酸序列，制备了抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体，利用该抗体开展的免疫组化实验发现水稻的 OsPIN1b 及小麦和玉米中的同源蛋白可以非极性定位在根和胚中子叶的表皮细胞的细胞质膜上，而大豆的 GmPIN1b 可以非极性的定位在根中表皮细胞的质膜上，但在胚的子叶表皮细胞中是细胞质定位。此外，水稻根表皮细胞质膜上的 OsPIN1b 可以通过内吞运输途径进入到细胞质中。这些 PIN1 定位结果将有助于我们研究生长素极性运输在水稻、小麦、玉米和大豆作物发育中的作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料为水稻品种日本晴和丽江新团黑谷（LTH）(*Oryza sativa subsp. japonica*)、小麦（*Triticum aestivum* ‘Chuanmai107’）、玉米（*Zea mays* ‘B73’）和大豆（*Glycine max* ‘Williams’），各作物种子置于 28 ℃ 条件下水培萌发，使用生长了 7 天的胚根分生区细胞和 1 天的子叶胚来检测 OsPIN1b 及同源物的亚细胞定位。

1.2 抗体的制备和检测

根据水稻 Nipponbare 的生长素输出载体 OsPIN1b（Os02g0743400）的氨基酸序列人工合成多肽 QSSRNPTPRGSSFNC，并将其注入新西兰兔体内。通过 ELISA 方法检测到纯化的抗兔 OsPIN1b 多克隆抗体，其浓度为 0.51 mg mL^{-1}（1：20000）（杭州华安生物技术有限公司）。

1.3 免疫杂交和免疫组化检测

为了检测 OsPIN1b 的表达，提取了水稻叶片和根的总蛋白，并用一抗：抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体（1:200）和二抗：山羊抗兔的 IgG-HRP（1:5000）进行了免疫杂交。为了检测蛋白亚细胞定位，使用或不使用 50 mM Brefeldin A（BFA）（Molecular Probes）对不同农作物的根和胚处理 90 min，然后使用改良的免疫组织化学分析方法进行检测(Paciorek et al., 2006)。具体如下：将样品在 25 ℃ 室温条件下用 4 %戊二醛溶液固定 1 h，然后 37 ℃ 条件下用 2 %崩溃酶处理 1 h，最后用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体（1:200）和二抗：驴抗兔的 IgG（H+L）-Alexafluor 488 抗体（1:500）（Jackson ImmunoResearch）进行免疫组化检测。使用 Leica SP5 激光共聚焦显微镜（Leica Microsystems）观察 OsPIN1b 的定位。

1. 4 生物信息学分析

从 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）获得 OsPIN1b 及其同源蛋白的氨基酸序列，通过在线网站（https://www.uniprot.org/）分析 OsPIN1b 的跨膜结构域， 使用软件 Vector NTI Suite 6 进行氨基酸序列比对，所有图片均使用 Photoshop 软件处理。

2 结果与分析

2.1 不同作物的 PIN1 序列相似性分析

为了检测不同作物中生长素输出载体蛋白 PIN1 的亚细胞定位，首先，我们对拟南芥（AtPIN1）、水稻（OsPIN1b）、小麦（TaPIN1）、玉米（ZmPIN1b）和大豆（GmPIN1b）中 PIN1 的氨基酸序列进行比对分析。结果表明 AtPIN1、TaPIN1、ZmPIN1b、GmPIN1b 的序列与 OsPIN1b 分别具有 58.6 %、61.5 %、62.5 %、61.9 %的相似性（图 1），在 OsPIN1b 的氨基酸序列中存在 10 个跨膜区。

```
OsPIN1b MITVVDLYHVLTAVVPLYVAMTLAYASVRWWRIFSPDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFISTNNPFAMNLRFLAADTLQKL 80
 TaPIN1 MITGTDFYHVMTAMVPLYVAMMLAYGSVKWWGIFTPDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFISTNNPYTMNLRFIAADTLQKL 80
ZmPIN1b MITGTDFYHVMTAVVPLYVAMILAYGSVRWWRIFSPDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFISTNNPYTMNLRFIAADTLQKL 80
GmPIN1b MITLTDFYHVMTAMVPLYVAMILAYGSVKWWKIFSPDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFIASNNPYEMNLRFLAADTLQKI 80
 AtPIN1 MITAADFYHVMTAMVPLYVAMILAYGSVKWWKIFTPDQCSGINRFVALFAVPLLSFHFIAANNPYAMNLRFLAADSLQKV 80

OsPIN1b IVLALLALWCRLSARGSLDWLITLFSLSTLPNTLVMGIPLLKGMYAAAADVDSGSLMVQIVVLQCIIWYTLMLFLFEYRG 160
 TaPIN1 IVLALLTLWSHLSRNGSLEWTITLFSLSTLPNTLVMGIPLLKGMYGDE----SGSLMVQIVVLQCIIWYTLMLFMFEYRG 160
ZmPIN1b MVLAMLTAWSHLSRRGSLEWTITLFSLSTLPNTLVMGIPLLKGMYGDF----SGSLMVQIVVLQCIIWYTLMLFMFEYRG 160
GmPIN1b IILVLLAVWSNIAKRGCLEWAITLFSLSTLPNTLVMGIPLLKGMYGDF----SGSLMVQIVVLQCIIWYTLMLFLFEFRG 160
 AtPIN1 IVLSLLFLWCKLSRNGSLDWTITLFSLSTLPNTLVMGIPLLKGMYGNF----SGDLMVQIVVLQCIIWYTLMLFLFEYRG 160

OsPIN1b ARLLVMEQFPDTAASIVSFRVDSDVVSLAGGGGAAELQAEAEVGDDGRMRVTVRKSTSSRSEAACSHGTQSHSQSMQPR 240
 TaPIN1 ARIPINRAVPDTAGAIASIAVDPDVMSLDGRR---DMIETEAEVKEDGKIHVTVRRSNASRSDIYSRR--SMGFSSTTPR 240
ZmPIN1b ARMLITEQFPDNAGAIASIVVDPDVVSLDGRR---DAIETEAEVKEDGRIHVTVRRSNASRSDIYSRR--SMGFSSTTPR 240
GmPIN1b ARMLISEQFPDTAGSIVSIHVDSDVMSLDGR----QPLETEAEIKEDGKLHVTVRKSNASRSDIFSRR--SQGLSSTTPR 240
 AtPIN1 AKLLISEQFPDTAGSIVSIHVDSDIMSLDGR----QPLETEAEIKEDGKLHVTVRRSNASRSDIYSRR--SQGLSATP-R 240

OsPIN1b VSNLSGVEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHAEFFNIVG---------------N------G--K--QGDEEKGAAG-------- 320
 TaPIN1 PSNLTNAEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHTDFYSMVG----RSSNFAAGDAFGPVVRTGATPRPSNYEEDKAGN--------- 320
ZmPIN1b PSNLTNAEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHNDFYSMVG----RSSNFGAADAFG--IRTGATPRPSNYEDDASKPK--YP--- 320
GmPIN1b PSNLTNAEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHTDFYSMMAAGG-RNSNFGASDVYGLSASRGPTPRPSNYDEDGGKPK------- 320
 AtPIN1 PSNLTNAEIYSLQSSRNPTPRGSSFNHTDFYSMMASGGGRNSNFGPGEAVFGSK--GPTPRPSNYEEDGGPAKPTAAGTA 320

OsPIN1b -----------GGG-----HSPQPVVGKRK---------------------------------DLHMFVWSSSASPVSE 400
 TaPIN1 ------------NNNSKYGQYPAPNPAMAAPQ---KPAKKAAN-GQAKGEDG-----------KDLHMFVWSSSASPVSD 400
ZmPIN1b ------LPVVNATSGAGAAHYPAPNPAVAAAP---KGARKAATNGQAKGED--------------LHMFVWSSSASPVSD 400
GmPIN1b -----FHYHAGGTG-----HYPAPNPGMFSPSNGSKSVAAANANANAKRPNGQAQLKPEDGN-RDLHMFVWSSSASPVSD 400
 AtPIN1 AGAGRFHYQSGGSGGGGGAHYPAPNPGMFSPNTGGGGGTAAKGNAPVVG--G----KRQDGNGRDLHMFVWSSSASPVSD 400

OsPIN1b RAAAAAAGAVHVFG------GGGADHGDAKG------------AQAYDEYSFGNKNEKDGPTLSKLGSNSTAQLRPKDDGE 480
 TaPIN1 VFG-NG---TEAYNDAAAK-DVRVAAASPRK----------ADGVERDEFSFGNK-----ERDAEAGDEKAAAEQGTAGLV 480
ZmPIN1b VFG-GG---APDYNEAAAAKSPRKMDGGKDR----------DDYVERDEFSFGNRGA--MDRDAEAGDGKAAAAGGDPSTV 480
GmPIN1b VFG------AHEYG---GHDQKEVKLNVSPGKVENHRDTQEDYLEKDEFSFGNR-------GMDREMNQLEGEK---VGD 480
 AtPIN1 VFGGGGGNHHADYSTATNDHQKDVKISVPQG-----NSNDNQYVEREEFSFGNK-------DDDSKVLATDGGNNISNKT 480

OsPIN1b GMAAAMPPASVMTRLILIMVWRKLIRNPNTYSSLLGVIWSLVSYRWGIEMPAIIARSISILSDAGLGMAMFSLGLFMALQ 560
 TaPIN1 AAPTVMPPTSVMTRLILIMVWRKLIRNPNTYSSLIGLIWSLVCFRRNFVMPAIIMKSIAILSDAGLGMAMFSLGLFMALQ 560
ZmPIN1b AAPTAMPPTSVMTRLILIMVWRKLIRNPNTYSSLIGVIWSLVCFRWNFQMPAIVLQSISILSDAGLGMAMFSLGLFMALQ 560
GmPIN1b GKPKTMPPASVMTRLILIMVWRKLIRNPNTYSSLIGLTWSLVSFKWNVEMPAIIAKSISILSDAGLGMAMFSLGLFMALQ 560
 AtPIN1 TQAKVMPPTSVMTRLILIMVWRKLIRNPNSYSSLFGITWSLISFKWNIEMPALIAKSISILSDAGLGMAMFSLGLFMALN 560

OsPIN1b PRIIACGNSLASYAMAVRFLVGPAVMAAASIAVGLRGVLLHIAIVQAALPQGIVPFVFAKEYNVHPNILSTAVIFGMLIA 640
 TaPIN1 PRIIACGNKRATFAMAVRFLTGPAVMAAASIAVGLRGTLLQIAIVQAALPQGIVPFVFAKEYSVHPDILSTAVIFGMLIA 640
ZmPIN1b PRIIACGNKVATFAMAVRFLTGPAVMAAASFAVGLRGTLLHVAIVQAALPQGIVPFVFAKEYNVHPDILSTAVIFGMLIA 640
GmPIN1b PRVIACGNSTAAFAMAVRFLTGPAVMAAASVAVGLKGVLLHVAIVQAALPQGIVPFVFAKEYNVHPDILSTAVIFGMLIA 640
 AtPIN1 PRIIACGNRRAAFAAAMRFVVGPAVMLVASYAVGLRGVLLHVAIIQAALPQGIVPFVFAKEYNVHPDILSTAVIFGMLIA 640

OsPIN1b LPITLVYYILLGL 653
 TaPIN1 LPITLVYYILLGL 653
ZmPIN1b LPITLVYYILLGL 653
GmPIN1b LPITLVYYILLGL 653
 AtPIN1 LPITLLYYILLGL 653
```

水稻，小麦，玉米，大豆和拟南芥之间的 PIN1 氨基酸序列比对，红框中的氨基酸序列为水稻 OsPIN1b 的跨膜结构域。

The PIN1 amino acid sequences were aligned among rice, wheat, maize, soybean and *Arabidopsis*, and red boxes show transmembrane domains of OsPIN1b amino acid sequeces.

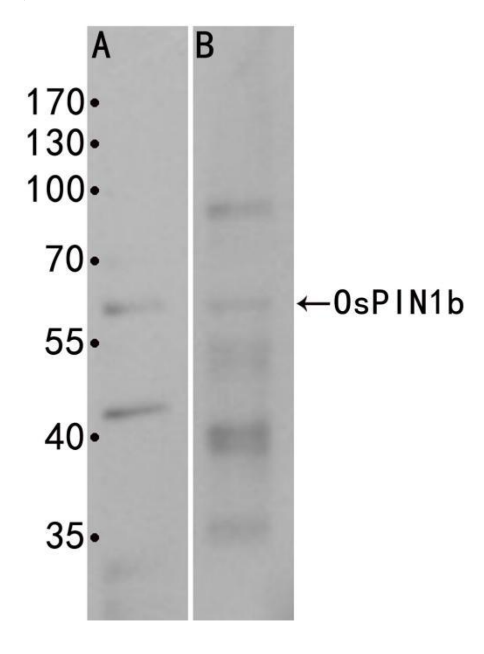
图 1 PIN1 的氨基酸序列比对

Fig. 1 PIN1 amino acid sequence alignment

2.2 水稻中 OsPIN1b 的检测

PIN1 序列在水稻、小麦、玉米和大豆之间显示出高度相似性（图 1）。我们选择 OsPIN1b

中的序列 QSSRNPTPRGSSFNC，通过人工合成多肽免疫兔子制备了抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体。为了检测抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体的有效性，我们提取了水稻叶片和根的总蛋白，并使用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体进行免疫杂交检测。结果表明用 OsPIN1b 抗体可以检测到目标蛋白 OsPIN1b（图 2）。



提取水稻日本晴叶片（**A**）和根（**B**）中的总蛋白，用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体进行免疫杂交。箭头指示目标蛋白 OsPIN1b 的条带。

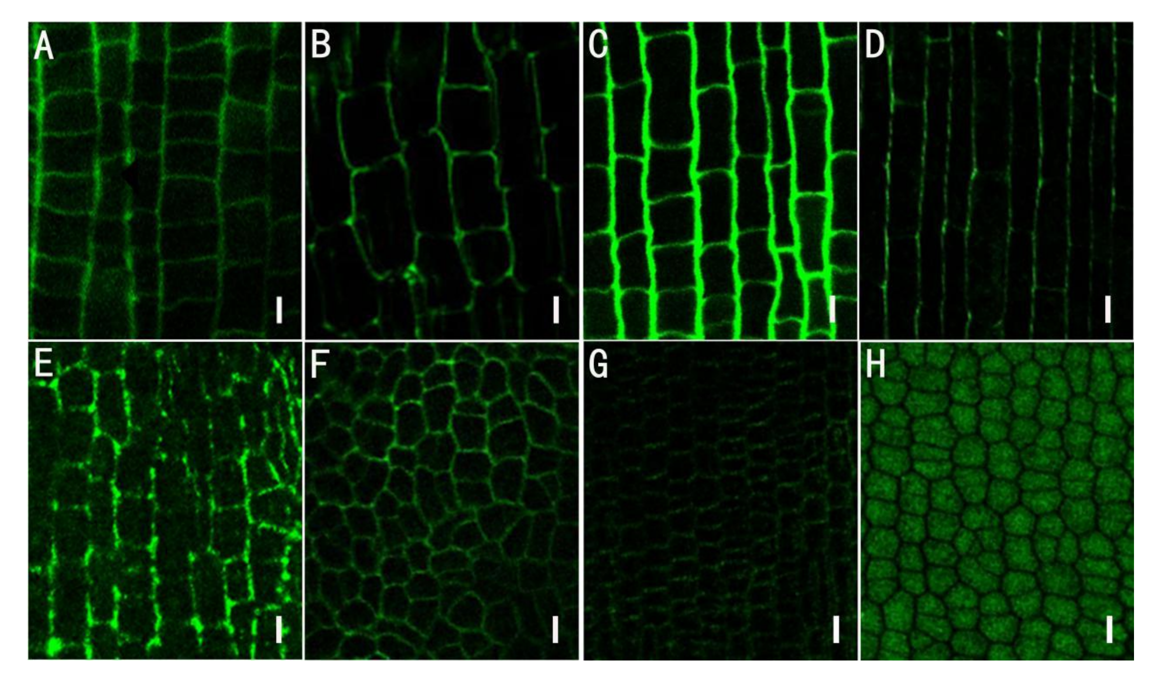
Total proteins of rice leaves (**A**) and roots (**B**) were isolated from rice Nipponbare and blotted with anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody. Arrow points to the target protein OsPIN1b.

图 2 蛋白免疫杂交检测水稻叶片和根中的 OsPIN1b

Fig. 2 Detection of OsPIN1b in rice leaves and roots by Western blot method

2.3 PIN1 在不同农作物中的亚细胞定位

我们通过免疫组织化学分析进一步检测了水稻、小麦、玉米和大豆根中 PIN1 的亚细胞定位，发现 PIN1 可定位于根表皮细胞的细胞质膜上，但没有明显的极性分布（图 3：A-D）。在检测 PIN1 在胚细胞中的定位时，发现 PIN1 可分布在水稻（图 3：E）、小麦（图 3：F）和玉米（图 3：G）胚中子叶表皮细胞的细胞质膜上，但没有明显的极性分布。大豆中的 GmPIN1b 非极性分布在根表皮细胞的细胞质膜上，而在胚的子叶表皮细胞中则分布于细胞质中（图 3：H）。



日本晴水稻（**A**，**E**），小麦（**B**，**F**），玉米（**C**，**G**）和大豆（**D**，**H**）的根（**A**–**D**）和胚（**E**–**H**）用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体开展免疫组化实验。标尺＝10 μm。

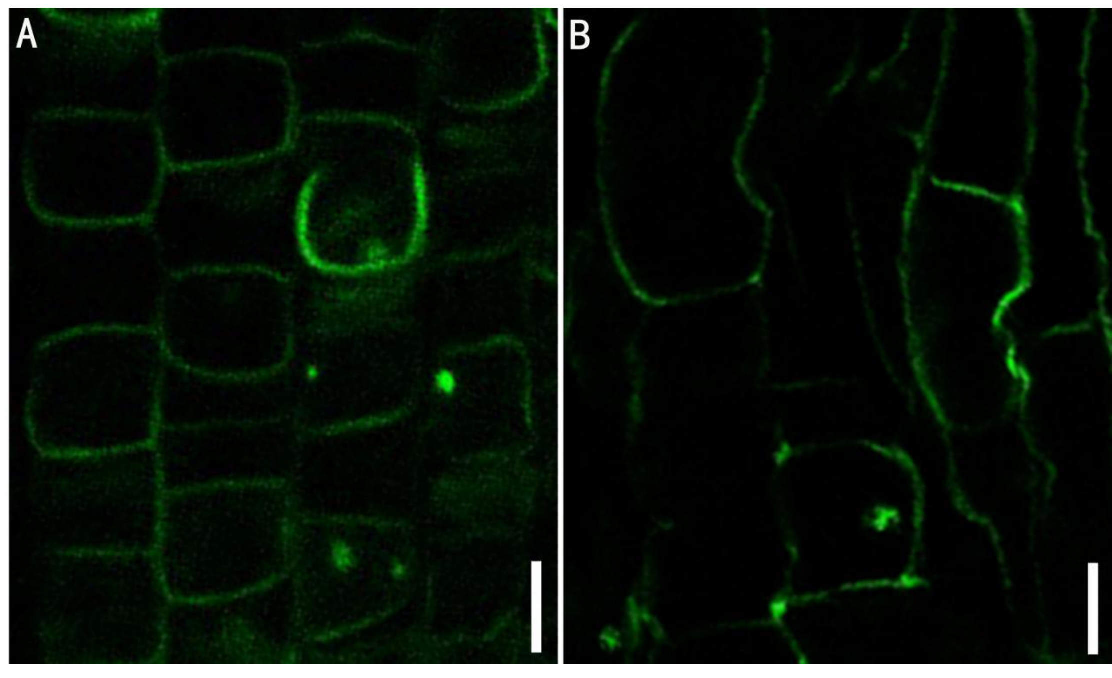
The roots (**A**-**D**) and embryos (**E**-**H**) of rice Nipponbare (**A**, **E**), wheat (**B**, **F**), maize (**C**, **G**) and soybean (**D**, **H**) were developed immunohistochemistry assay with anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody. Bar = 10 μm.

图 3 PIN1 在根和胚的子叶表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of PIN1 in root and embryo epidermal cells

2.4 水稻中 OsPIN1b 的胞吞检测

由于 OsPIN1b 蛋白定位于细胞质膜上（图 3：A，E），因此我们进一步检测了 OsPIN1b 是否可以通过胞吞的方式从细胞质膜转运入细胞质。用蛋白转运抑制剂 BFA 处理水稻 Nipponbare 和 LTH 的根尖，用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体开展免疫组织化学实验，我们发现在细胞质中可以检测到 OsPIN1b 蛋白的聚集（图 4）。这表明 OsPIN1b 可以通过胞吞途径从细胞质膜转移到细胞质中。



用 25 μmol・L^{-1} BFA 处理水稻品种 LTH（**A**）和 Nipponbare（**B**）的根尖 90 min，然后用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体通过免疫组化检测 OsPIN1b 的胞吞。箭头指示根表皮细胞胞质中 OsPIN1b 蛋白聚集体。标尺＝10 μm。

Roots of rice lines LTH (**A**) and Nipponbare (**B**) were treated with 25 μmol・L^{-1} BFA for 90 minutes, and blotted with anti-rabbit OsPIN1b polyclonal antibody by immunohistochemistry assay. Arrow points to the OsPIN1b internalization in cytoplasma of root epidermal cells. Bar = 10 μm.

图 4 水稻根表皮细胞中 OsPIN1b 的胞吞检测

Fig. 4 Endocytosis detection of OsPIN1b in the cytoplasma of rice root epidermal cells

3 讨论与结论

生长素输出载体蛋白 PIN 家族在植物发育中起着至关重要的作用。在这项研究中，我们利用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体有效检测了水稻、小麦、玉米和大豆的胚根分生区表皮细胞及胚中子叶表皮细胞的 OsPIN1 及其同源物的亚细胞定位，我们发现 OsPIN1b 及其同源物分布在水稻、小麦、玉米和大豆的根和胚中子叶表皮细胞的细胞质膜及细胞质中。不同作物中的相同细胞定位表明 PIN1 在不同植物发育中，其调节生长素分布的功能是保守的。此外，我们也注意到与拟南芥 AtPIN1 的极性定位相比（Friml et al., 2003），在不同农作物的根表皮细胞中，OsPIN1 及其同源物的定位是非极性的。OsPIN1b 的氨基酸序列与 AtPIN1 具有 58.6 % 的相似性，因此，不同作物和拟南芥 AtPIN1 蛋白的亚细胞定位模式存在的差异可能与不同植物中 PIN1 蛋白结构差异有关。玉米中的 ZmPIN1a 在不同玉米组织中的定位存在极性定位（Carraro et al., 2006; Gallavotti et al., 2008; Moon et al., 2013; Kamada et al., 2018）、非极性定位 （Skirpan et al., 2009）和胞质定位 （Forestan et al., 2012），一些研究也发现 AtPIN1 的极性分布与胚发育中的生长素动态相关（Friml et al., 2003）。在该项研究中，用于 OsPIN1b 及其同源物细胞定位观察的胚根及子叶胚都处于植物发育的早期阶段，这表明不同作物中 PIN1 的定位还与作物组织发育阶段有关。利用抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体可以检测到 OsPIN1b 蛋白。我们进一步分析发现 OsPIN1b 与 OsPIN1a 氨基酸序列相似性为 62.4 %，OsPIN1a 与 OsPIN1b 蛋白分子量分别为 64.7 kD 和 59.3 kD，且 OsPIN1a 氨基酸序列中含有用于制备抗兔的 OsPIN1b 多克隆抗体的序列 QSSRNPTPRGSSFNC。因此，我们不能完全排除所检测到的蛋白条带中含有 OsPIN1a，而这也可能部分解释了我们在根表皮细胞中所观察到的 OsPIN1b 及其同源物的非极性定位。

PIN 蛋白由于胞吞作用而产生的细胞定位的改变可影响生长素的极性运输，从而进一步调控器官形成（Kleine-Vehn et al., 2008）。在该项研究中，我们发现 OsPIN1b 可以通过胞吞途径进入到细胞质中。这显示由于细胞的胞吞作用，OsPIN1b 及其同源物的细胞质膜及细胞质定位可能会发生变化，并参与调控植物内生长素的分布。PIN 蛋白的细胞定位可受到其它物质如水杨酸的调控（Du et al., 2013）。但是，我们观察到 OsPIN1b 的定位可由于自身胞吞作用而改变，因此，不同作物中 PIN1 蛋白的亚细胞定位是一个动态的过程。

不同作物中 OsPIN1b 及其同源物可非极性定位于细胞质膜及细胞质中，这是一个动态的分布过程，并与植物所处的发育阶段密切相关。OsPIN1b 及其同源物的亚细胞定位将有助于我们揭示生长素输出载体通过影响生长素极性分布而参与调控农作物中根和胚发育的分子机制。

登录号

文章中相关蛋白在 NCBI 数据库中的登录号分别为 AtPIN1 (NP_177500.1)、OsPIN1b (XP_015616014.1)、TaPIN1 (AAS19858.1)、ZmPIN1b (ABH09243.1)、GmPIN1b (NP_001237546.2)。

参考文献:

BENJAMINS R, SCHERES B, 2008. Auxin: the looping star in plant development [J]. Ann Rev Plant Biol, 59(1): 443-465.

BLILOU I, XU J, WILDWATER M, WILLEMSEN V, et al., 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots [J]. Nature, 433(7021): 39-44.

CARRARO N, FORESTAN C, CANOVA S, et al., 2006. ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize [J]. Plant Physiol, 142(1): 254-264.

CASIMIRO I, MARCHANT A, BHALERAO RP, et al., 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation [J]. The Plant Cell, 13(4): 843-852.

DU Y, TEJOS R, BECK M, et al., 2013. Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking [J]. PNAS, 110(19): 7946-7951.

FORESTAN C, FARINATI S, VAROTTO S, 2012. The maize PIN gene family of auxin transporters [J]. Front Plant Sci, 3(16):16.

FRIML J, VIETEN A, SAUER M, et al., 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* [J]. Nature (London), 426(6963): 147-153.

GALLAVOTTI A, YANG Y, SCHMIDT RJ, et al., 2008. The relationship between auxin transport and maize branching [J]. Plant Physiol, 147(4): 1913-1923.

GALWEILER L, GUAN C, MULLER A, et al., 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue [J]. Science, 282(5397): 2226-30.

GELDNER N, FRIML J, STIERHOF YD, et al., 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking [J]. Nature, 413(6854): 425-8.

GUENOT B, BAYER E, KIERZKOWSKI D, et al., 2012. PIN1-independent leaf initiation in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 159(4): 1501-10.

KAMADA M, MIYAMOTO K, OKA M, et al., 2018. Procedures for chemical fixation in immunohistochemical analyses of PIN proteins regulating polar auxin transport: relevance to spaceflight experiments [J]. Life Sci Space Res (Amst), 18: 42-51.

KLEINE-VEHN J, DHONUKSHE P, SAUER M, et al., 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis* [J]. Curr Biol, 18(7): 526-31.

LI Y, ZHU J, WU L, et al., 2019. Functional divergence of PIN1 paralogous genes in rice [J]. Plant Cell Physiol, 60(12): 2720-2732.

MOON J, CANDELA H, HAKE S, 2013. The Liguleless narrow mutation affects proximal-distal signaling and leaf growth [J]. Development, 140(2): 405-412.

PACIOREK T, SAUER M, BALLA J, et al., 2006. Immunocytochemical technique for protein localization in sections of plant tissues [J]. Nature Protocols, 1(1): 104-107.

PALME K, GALWEILER L, 1999. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport [J]. Curr Opin Plant Biol, 2(5): 375-381.

SKIRPAN A, CULLER AH, GALLAVOTTI A, et al., 2009. BARREN INFLORESCENCE2 interaction with ZmPIN1a suggests a role in auxin transport during maize inflorescence development [J]. Plant Cell Physiol, 50(3): 652-657.

SINGH K, SINGH J, JINDAL S, et al., 2018. Structural and functional evolution of an auxin efflux carrier PIN1 and its functional characterization in common wheat [J]. Funct Integr Genomic, 19(1): 29-41.

WANG Y, CHAI C, VALLIYODAN B, et al., 2015. Genome-wide analysis and expression profiling of the PIN auxin transporter gene family in soybean (Glycine max) [J]. BMC Genomics, 16(1): 951.

XU M, ZHU L, SHOU H, et al., 2005. A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice [J]. Plant Cell Physiol, 46 (10): 1674-1681.